

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Obecná biologie



Pavλίna Valtrová

Meióza a fertilita juvenilních myších samců

Meiosis and fertility of juvenile mouse males

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Zdeněk Trachtulec, Ph. D.

Praha, 2019

Poděkování

Největší poděkování patří mému školiteli Ing. Zdeňkovi Trachtulci, Ph. D. za trpělivost a cenné rady při konzultacích. Zároveň bych chtěla poděkovat rodičům za podporu při psaní bakalářské práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2019

Podpis

Abstrakt

Úkolem této práce je shrnout literaturu zabývající se zvláštnostmi spermatogeneze juvenilních myší (*Mus musculus*) a možnostmi jejich využití. Spermatogeneze je proces, který vede skrze meiotické dělení ke vzniku spermií. Buňka prochází ve vlnách buněčnými typy: spermatogonie, spermatocyty, spermatidy a spermie. Juvenilní myši (kde množství spermií a velikost testes nedosáhly maxima) jsou často využívány pro studium jednotlivých typů buněk. U juvenilních myší trvá přechod mezi buněčnými typy kratší dobu. Spermie vznikající během první vlny spermatogeneze (zkratka VS) jsou odvozené přímo z prenatálních gonocytů, což umožňuje dřívější produkci spermií. Mají nižší četnost crossing overu (CO) kvůli odlišnému zpracování meiotických meziproductů CO; následkem mohou být aneuploidie (o chromozom více nebo méně). Spermie z 2.VS mají také nižší četnost CO. Během 3.VS sestupují testes a teplota klesá na 33°C; četnost CO více podobá dospělcům. Až ve 4.VS maturují podpůrné testikulární buňky, které mj. produkují testosteron, a četnost CO je jako u dospělých. U juvenilních myší je též častější výskyt a vyšší závažnost malformací spermií. Nízká četnost CO by neměla mít na fertilitu vliv; chyby jsou eliminovány v kontrolních bodech meiózy. Je ale zajímavé, že potomci mladých mužů mají vyšší riziko aneuploidií, např. Downova syndromu, což je možná kvůli nízké četnosti CO a následné chybné distribuce chromozomů během meiózy.

Klíčová slova: fertilita, juvenilní samci, meióza, spermatocyty, spermatogeneze, spermatogoniální kmenové buňky, spermie, testis

Abstract

This work is a summary of literature on peculiarities of spermatogenesis in juvenile mouse males (*Mus musculus*) and their utilization. Spermatogenesis is a process that leads through meiosis to sperm production. The cell undergoes in waves the following cell types: spermatogonia, spermatocytes, spermatids, and spermatozoa. Juvenile mice (whose testes size and sperm count have not reached their maximum) are often used to study individual cell types. The transition between cell types takes shorter time in juveniles. Spermatozoa from the 1st wave of spermatogenesis (WS) are derived from prenatal gonocytes, allowing earlier sperm production. They have a lower frequency of crossing over (CO rate) due to a different processing of CO intermediates; the consequence can be aneuploidy (one chromosome less/more). Spermatozoa from the 2nd WS still display lower CO rate. In 3rd WS testes descend and their temperature decreases to 33°C; CO rate is more like in adults. In 4th WS is typical testicular supportive cells mature and CO rate is similar to adult levels. Juvenile males also suffer from more frequent and severe sperm malformations. Low CO rate should not have an impact on fertility; errors are eliminated during meiotic checkpoints. However, the children of young fathers have a higher risk of aneuploidy, such as Down syndrome, which might be caused by low CO rate and subsequent chromosome segregation errors during meiosis.

Key words: fertility, juvenile males, meiosis, spermatocytes, spermatogenesis, spermatogonial stem cells, spermatozoa, testis

Seznam zkratk

ATP	adenosintrifosfát
AE	axiální element
CE	centrální element
CO	crossing over
DAPI	4',6-Diamidin-2-fenylindol; fluorescenční barvivo
DMC1	protein vázající se na jednovláknový úsek DNA během homologické rekombinace
FSH	folikulostimulační hormon
HORMAD1	protein tvořící axiální element uplatňující se při vzniku synapsí
HORMAD2	protein tvořící axiální element uplatňující se při vzniku synapsí
ICSI	intracytoplazmatická injekce
LA	laterální element
LH	luteinizační hormon
MLH1/MLH3	rekombinázy s endonukleolytickou aktivitou uplatňující se během CO
MSH4/MSH5	rekombinázy s endonukleolytickou aktivitou uplatňující se během CO
NCO	non-crossing over
RAD51	protein vázající se na jednovláknový úsek DNA během homologické rekombinace
RAR	receptor pro kyselinu retinovou
RARE	retinoic response element
RPA	replication protein A
RPA2	homolog RPA
RXR	receptor pro retinoid
SYCE1	protein tvořící centrální element synaptonemálního komplexu
SYCE2	protein tvořící centrální element synaptonemálního komplexu
SYCE3	protein tvořící centrální element synaptonemálního komplexu
SYCP1	protein tvořící transversální filamenta
SYCP2/3	proteiny tvořící axiální, resp. laterální element
TEX12	protein tvořící centrální element synaptonemálního komplexu
TF	transverzální tubuly

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Meióza	2
2.1	Fáze meiotického dělení.....	2
2.2	Rekombinace, crossing over a chiazmata.....	5
3	Testes a spermatogeneze	6
3.1	Testes.....	6
3.2	Spermatogeneze.....	8
3.2.1	Morfologie zralé spermie	9
3.3	Kyselina retinová a její úloha v procesu spermatogeneze	10
3.3.1	Význam	10
3.3.2	Syntéza	10
4	Fertilita juvenilních jedinců	11
4.1	Vývoj testes během pohlavního dospívání.....	11
4.1.1	Vývoj testes u myši	11
4.1.2	Vývoj testes u člověka	12
4.2	Vliv absence kyseliny retinové na diferenciaci spermatogoniálních kmenových buněk	14
4.3	Průběh první vlny spermatogeneze.....	14
4.4	Rychlost diferenciaci spermatogoniálních kmenových buněk	16
4.5	Meiotická homologická rekombinace během prvních tří vln spermatogeneze.....	18
4.6	Malformace spermií a ovlivnění věkem myši	21
4.7	Disociace chromozomů	22
4.7.1	Myš	22
4.7.2	Genetické vady jako důsledek disociace chromozomů u lidí	24
5	Využití juvenilních samců	25
6	Závěr	28
7	Použitá literatura	30

1 Úvod

Tato práce se zabývá fertilitou juvenilních myší; jejich definice se v jednotlivých publikacích liší. V publikacích zabývajících se fertilitou velmi mladých myší je za „juvenilní“ považováno taková, jejíž produkce spermií a velikost testes nedosáhly maxima, k čemuž dochází mezi dny 70-77 (Vrooman et al. 2014; Zelazowski et al. 2017; Picut et al. 2018). Jinde je za „juvenilní“ považováno období během pohlavního dospívání u myši staré 21-32 dní (Picut et al. 2018). Já jsem si pro svoji práci vybrala první z výše uvedených definic. Fertilita je u samců definovaná jako schopnost produkce spermií, samčích gamet, které následně oplodní vajíčko, samičí gametu (Gerhard 2013). Období, během kterého se juvenilní myš stává fertilní, se nazývá puberta, někdy také maturace (Picut et al. 2018). Puberta je nejčastěji definovaná anatomickými nebo hormonálními změnami. Za začátek puberty se považuje doba, kdy se v semenotvorném kanálku objeví první spermie. Časový průběh puberty se u konkrétních živočichů v jednotlivých publikacích může lišit, protože tyto události jsou ovlivněny genetickým pozadím a variabilitou mezi jedinci. Pokud jde o vývoj testes, jednotlivé po sobě jdoucí události jsou stejné pro všechny druhy. Doba, než je maturace dokončena a v testes je viditelná kompletní spermatogeneze, se mezi jednotlivými živočišnými druhy liší; u hlodavců probíhají v řádu několika dní, u člověka několik let. Maturace testes zahrnuje procesy probíhající v prenatálním i postnatálním období; patří mezi ně přeměna gonocytů na spermatogonie, proliferace Sertoliho buněk a spermatogonií, diferenciace spermatogonií na spermatocyty, jejich meiotické dělení a následná spermiogeneze; tj. diferenciace kulatých spermatid do elongovaných spermatid a následně do spermií.

2 Meióza

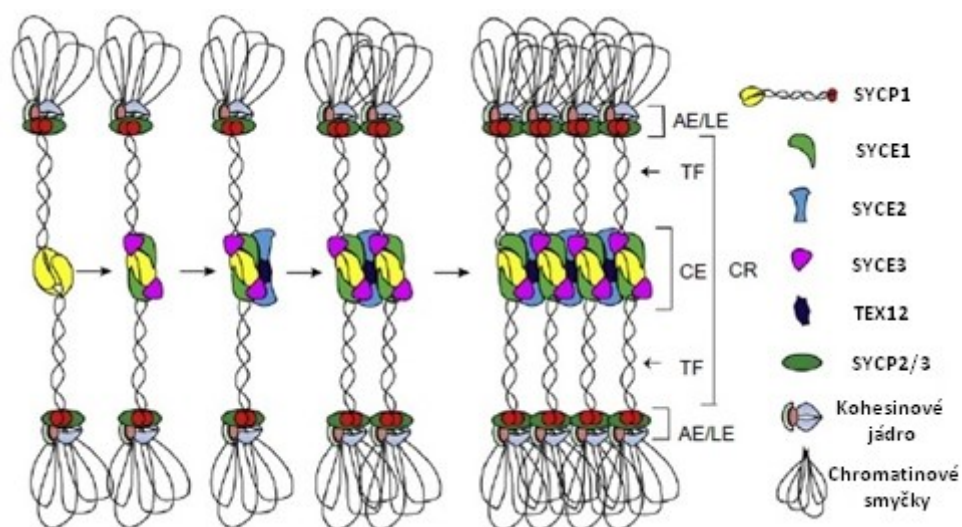
Meióza neboli redukční dělení, je proces, při kterém se počet chromozomů sníží na polovinu; z jedné diploidní buňky vzniknou čtyři buňky haploidní (Snustad a Simmons 2017; Bolcun-Filas a Schimenti 2012). Meióza je součástí pohlavního rozmnožování a uplatňuje se tedy i během spermatogeneze, což je proces, při kterém vznikají samčí pohlavní buňky. Chromozomy v buňkách tvoří páry, tzn. každý je v buňce přesně dvakrát. Ty, co tvoří jeden pár, se nazývají homologické. Pokud se jedná o autozomální chromozomy, alely konkrétních genů mají většinou u každého chromozomu stejný lokus, tzn. stejnou polohu na chromozomu, jednotlivé alely se ale mezi sebou mohou lišit. Pokud se jedná o heterogametické pohlaví, např. typ *Drosophila* (samice mají pohlavní chromozomy XX, samci XY), chromozomy X a Y se od sebe navzájem liší. Chromozom X je menší a centromera je umístěná blíže k jednomu konci ramen. Dále mají málo stejného genetického materiálu; krátké segmenty vykazující homologii nacházíme jen v koncových oblastech. Myš má celkem 20 párů chromozomů, z toho 19 autozomů a 1 pár tvoří pohlavní chromozomy. Člověk má 23 párů; 22 autozomálních a 1 tvoří pohlavní chromozomy. Na konci meiózy každá buňka obdrží přesně jeden chromozom z každého páru.

2.1 Fáze meiotického dělení

Meióza má dvě části: meióza I a meióza II (Snustad a Simmons 2017). Před začátkem meiotického dělení dojde k replikaci chromozomů (Bolcun-Filas a Schimenti 2012; Snustad a Simmons 2017). Poté buňka projde prvním meiotickým dělením, během kterého se snižuje počet chromozomů na polovinu, výsledkem jsou dvě diploidní buňky. V druhé fázi meiotického dělení se znovu redukuje na polovinu a vznikají haploidní buňky. Meióza I i meióza II mají 4 fáze: profáze, metafáze, anafáze a telofáze.

V první fázi meiotického dělení se označují profáze I, metafáze I, anafáze I a telofáze I. Správný průběh meiózy je zásadní pro úspěšnou produkci haploidních gamet (Morelli et al. 2008). Profáze I se skládá z pěti různých stádií: leptotén, zygotén, pachytén, diplotén a diakinéza (Snustad a Simmons 2017). Zahrnují rekombinaci, párování homologických chromozomů a vznik synapsí. V leptoténu dochází ke kondenzaci chromozomu; vzniká axiální element, což je na proteiny bohaté lešení, které drží sesterské chromatidy pohromadě až do druhého meiotického dělení (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). V zygoténu se homologické chromozomy začínají párovat prostřednictvím centrálního elementu (Bolcun-Filas a Schimenti

2012). Centrální element je částí proteinového komplexu, který se nazývá synaptonemální komplex a drží homology pohromadě (Bolcun-Filas a Schimenti 2012; Snustad a Simmons 2017). Synaptonemální komplex se skládá ze dvou paralelních axiálních elementů; v kontextu synaptonemálního komplexu se nazývají laterální elementy a jsou propojené pomocí transverzálních filament, kde je jeden konec ukotvený k laterálnímu elementu a druhý k centrálnímu, viz obrázek níže (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). Hlavní proteiny tvořící synaptonemální komplex se nazývají SYCP1, SYCP2 a SYCP3. SYCP1 tvoří transverzální filamenta a SYCP2 s SYCP3 axiální, resp. laterální element.



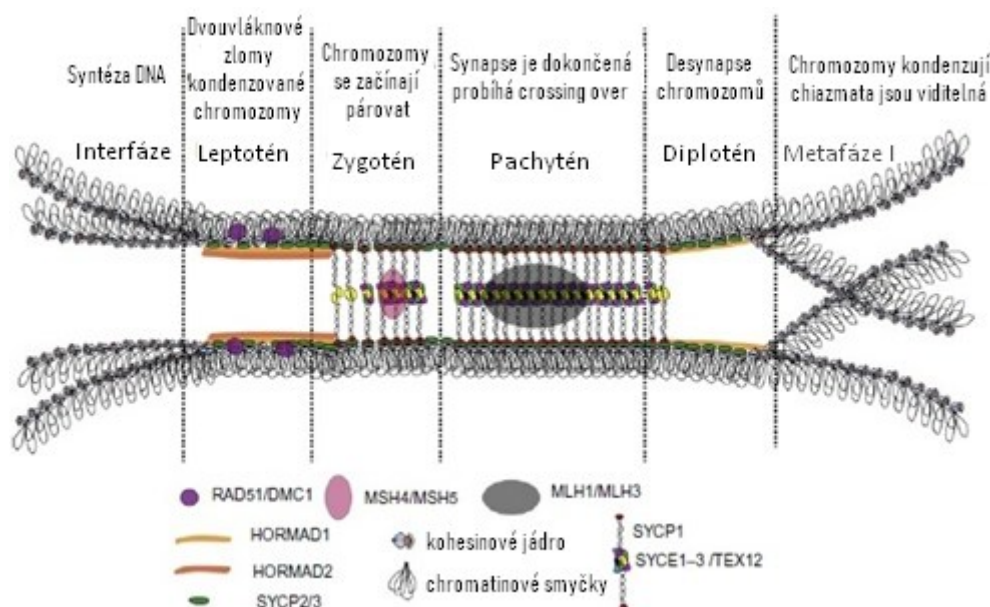
Obrázek č. 1: model formování synaptonemálního komplexu (převzato a upraveno z Bolcun-Filas a Schimenti 2012);

- 1) N-konce SYCP1 homodimerů vzájemně asociují
- 2) Pro stabilizaci komplexu je nutný komplex SYCE1/3
- 3) Interakce centrálního elementu s komplexem SYCE2/TEX12 je důležitá k propagaci synaptonemálního komplexu a formování synaptonemálního komplexu

TF-transverzální tubuly, AE/LE-axiální element/laterální element, CE-centrální element

V pachyténu jsou nejlépe patrné bivalenty, páry homologických chromozomů (Snustad a Simmons 2017). Pokud hovoříme o jednotlivých chromatidách, tvoří tetrády. Během této fáze také dochází k výměně genetického materiálu, rekombinaci (viz níže). Jeden ze způsobů rekombinace je crossing over, který vede k vzniku chiazmat. V diploténu se chromozomy začínají oddělovat, ale stále jsou spojeny v místě crossing overu, tato místa se označují jako chiazmata (Snustad a Simmons 2017). Chiazmata jsou důležitá pro správné seřazení a segregaci homologických chromozomů během metafáze I (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). Poslední fází profáze I je diakinéza, kdy zaniká jaderný obal, vzniká dělicí vřeténko a

chromozomy putují k ekvatoriální rovině, která je kolmá na osu dělicího vřeténka (Snustad a Simmons 2017). Během metafáze I jsou chromozomy tvořící pár orientovány k opačným pólům dělicího vřeténka, což zajistí rovnoměrné rozdělení genetické informace do vznikajících buněk. Dochází k terminalizaci chiazmat, což znamená, že chiazmata držící bivalenty pohromadě se posouvají směrem ke koncům chromozomů.



Obrázek č. 2: časové schéma dějů mezi homologickými chromozomy během profáze I (převzato a upraveno z Bolcun-Filas a Schimenti 2012)

Komplex RAD51/DMC1 jsou proteiny, které po vzniku dvouvláknového zlomu najdou homologický úsek na nesesterské chromatidě a navedou tam 3' přečnávající konec

Komplexy MSH4/MSH5, MLH1/MLH3 jsou rekombinázy s endonukleázovou aktivitou uplatňující se během CO

SYCP2/3, SYCP1, SYCE1-3/TEX12 jsou proteiny tvořící synaptonemální komplex

HORMAD1, HORMAD2 jsou proteiny součástí axiálního elementu, uplatňují se při vzniku synapsí

V anafázi I dochází k chromozomové disjunkci; mikrotubuly dělicího vřeténka se zkracují a chromozomy se tak rozcházejí k opačným pólům buňky (Snustad a Simmons 2017). Během poslední fáze meiózy I, telofáze I, dochází k rozpadu dělicího vřeténka, vzniká jaderný obal, dceřiné buňky se oddělují plazmatickou membránou a chromozomy dekondenzují.

Následuje meióza II. Během profáze II dochází ke kondenzaci chromozomů, na které se následně připojuje dělicí vřeténko. V metafázi II jsou chromozomy v ekvatoriální rovině a sesterské chromatidy se orientují k opačným pólům buňky. V anafázi II se chromatidy rozcházejí k opačným pólům buňky a v telofázi II opět vznikají nové dceřiné buňky. Každá buňka vzniklá meiózou obsahuje haploidní sadu chromozomů.

2.2 Rekombinace, crossing over a chiazmata

Homologická rekombinace je proces, během kterého dochází k výměně genetické informace mezi úseky DNA s podobnou sekvencí (Alberts et al. 1998), a který je iniciován na začátku profáze I dvouvláknovými zlomy (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). Během rekombinace jsou vzniklé zlomy opravené, a to dvěma způsoby; buď noncrossing overem (NCO) nebo crossing overem (CO). Při CO se mezi chromozomy vytváří spoje, které jsou důležité pro správný průběh meiózy. Většina dvouvláknových zlomů je ale opravena alternativními cestami, během kterých k CO nedochází.

CO i NCO začínají vznikem zlomu a exonukleolytickou reakcí na 5'konci, čímž vznikne 3'přečnívající konec, který je posléze zaveden do homologického úseku spárovaného chromozomu (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). Pokud oba konce vzniklého zlomu interagují se stejnou chromatidou, formují Hollidayův spoj, který může vést k CO. CO může nastat jen v případě, že je jako templát k opravě použita nesesterská chromatida (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). Hollidayův spoj je meziprodukt, který vzniká během výměny vláken; je to dočasná čtyřvláknová struktura, která následně prochází štěpením a ligací (Alberts et al. 1998). Během každého CO jsou dvě ze čtyř chromatidy rekombinované (Snustad a Simmons 2017). Při meiotické rekombinaci ale může docházet k mnohonásobným výměnám. V určitém místě totiž rekombinují sice jen dvě chromatidy, ale v jiném mohou rekombinovat jiné dvě chromatidy.

Při homologické rekombinaci, během které se uplatňuje CO, je zapojeno mnoho proteinů (Guillon et al. 2005). Jedním z nich je MLH1, což je homolog MutL. MutL jsou všeobecně proteiny, které mají endonukleázovou aktivitu, tzn. štěpí DNA řetězec (Guarné 2012). Mimo to, že opravují chyby vznikající při replikaci DNA, podílí se také na rekombinaci DNA. MLH1 jsou přítomné na místech interhomologického CO a chiazmat, u myší deficientních pro MLH1 bylo chiazmat méně a myši byly sterilní (Baker et al. 1996). U myší dochází běžně ve středním pachytému k desynapsi X a Y chromozomů, úplně se ale neoddělují; zůstávají spojené v pseudoautozomální oblasti (PAR), nejspíš prostřednictvím chiazmat. U myší deficientních pro MLH1 byly ve středním pachytému chromozomy X a Y zcela oddělené, zatímco autozomy zůstaly spojené prostřednictvím synapsí (Baker et al. 1996). V metafázi I, kdy jsou chromozomy běžně propojeny prostřednictvím chiazmat, byly u myších deficientních pro MLH1 univalentní všechny homology; a to jak pohlavní chromozomy tak autozomy (Baker et al. 1996).

Po vzniku dvouvláknových zlomů a exonukleolytické reakci jsou ke zformovanému jednovláknovému úseku DNA rekrutovány rekombinázy RAD51 a DMC1 (Bolcun-Filas a Schimenti 2012). RAD51/DMC1 komplex navázaný na chromozom najde homologický úsek a zajistí následnou výměnu vlákna DNA. Ještě předtím, než je DNA asociována s MLH1/MLH3 komplexem, dojde po vzniku synapse k nahrazení RAD51/DMC1 za RPA a MSH4/MSH5 komplexy.

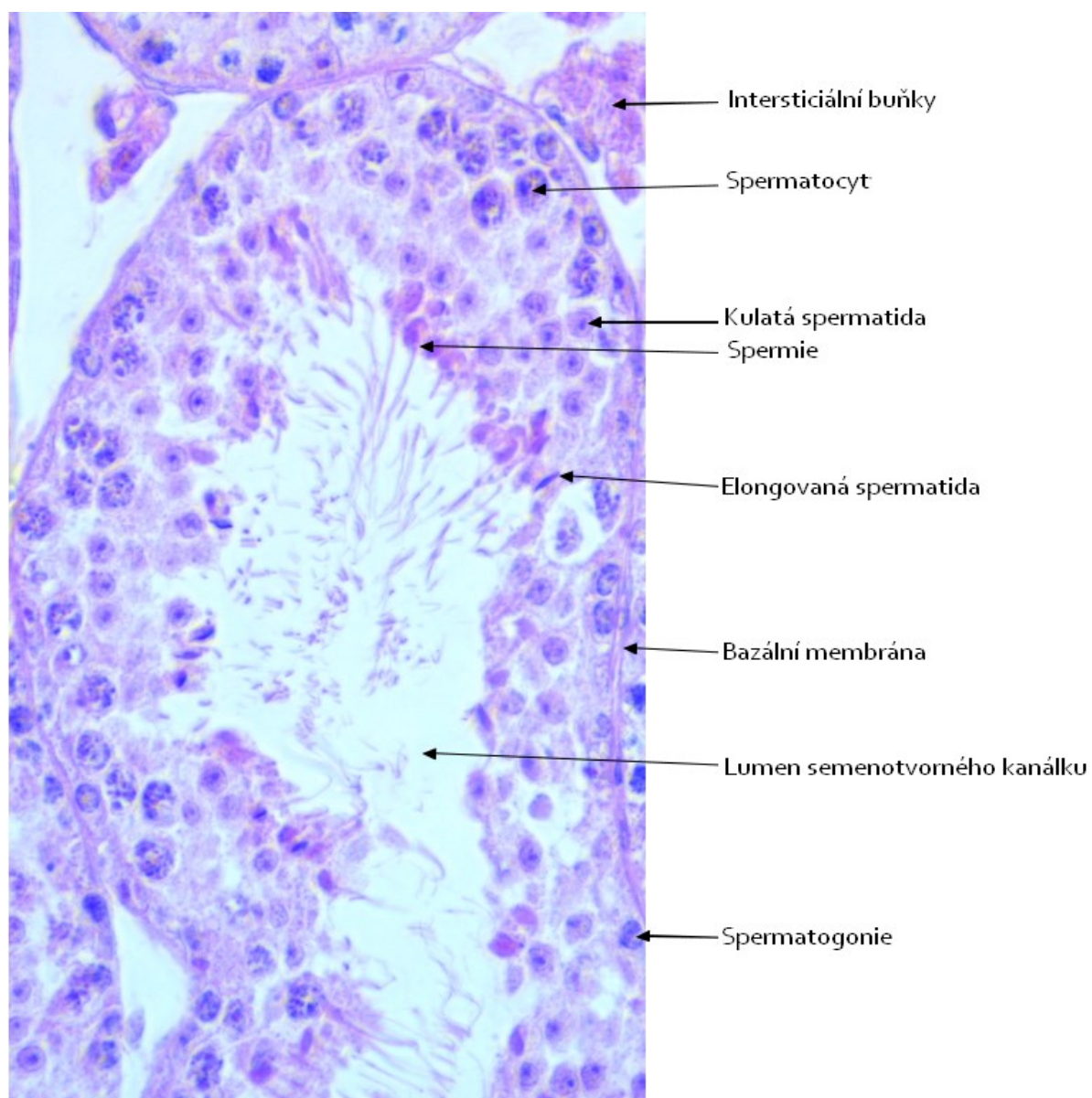
Chiazmata jsou nejvíce viditelná v pozdní profázi I. Chromozomy tvořící pár jsou spojeny jen v oblasti centromer a CO. Četnost chiazmat přímo souvisí s délkou chromozomů; u delších chromozomů nacházíme chiazmat více.

3 Testes a spermatogeneze

3.1 Testes

Varle, testis, je samčí pohlavní žláza (nejen) obratlovců (Gerhard 2013). Funguje jako endokrinní žláza, produkuje testosteron a je to také místo, kde probíhá spermatogeneze. Skládá se ze semenotvorných kanálků a řídkého vaziva (Nakata 2019; Gerhard 2013). Semenotvorné kanálky tvoří přibližně 85 % testes (Gerhard 2013). V kanálku vznikají spermie, které putují do nadvarlete. Po okrajích semenotvorného kanálku se nachází kmenové buňky, spermatogonie, které udržují svůj stálý počet mitotickým dělením a dávají vznik spermiím (viz spermatogeneze) (Hess a de Franca 2009; Gerhard 2013).

Po okrajích semenotvorného kanálku se kromě spermatogonií nalézají Sertoliho buňky, které u myši tvoří přibližně 15 % všech buněk (Hess a Franca 2005); jsou mezi sebou spojené těsnými spoji (Hess a de Franca 2009) a mají podpůrnou a regulační funkci během procesu spermatogeneze (Gerhard 2013; Hess a de Franca 2009). Kontrolují uvolnění spermií do lumen semenotvorného kanálku, sekretují tekutinu, proteiny a růstové faktory a mají schopnost fagocytózy (Hess a de Franca 2009). Jejich funkce je stimulovaná FSH a testosteronem (Walker a Cheng 2005). Každá Sertoliho buňka může podporovat vývoj přesně daného počtu buněk; v dospělých testes je počet Sertoliho buněk jedním z faktorů určujících velikost testis a množství vyprodukovaných spermií za den (Sharpe et al. 2003). Dalšími buňkami varlete jsou Leydigovy buňky produkující testosteron, které jsou lokalizované mezi semenotvornými kanálky (Tillinger 1957; Gerhard 2013).

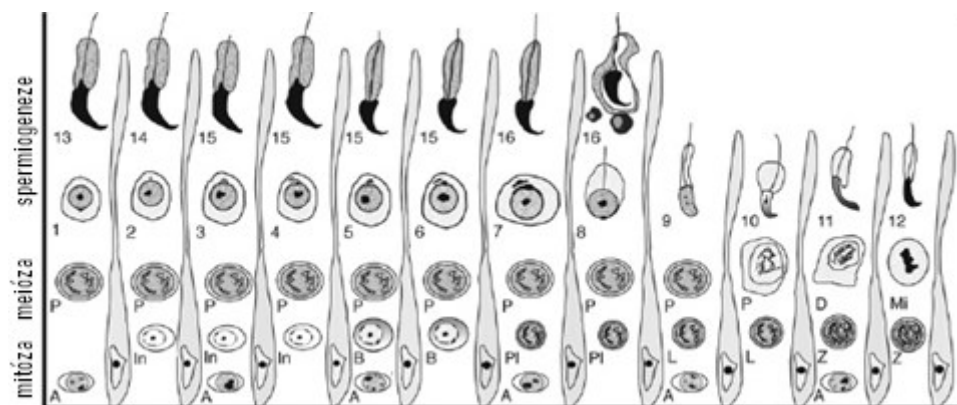


Obrázek č. 3: průřez semenotvorným kanálkem (dospělá laboratorní myš, kmen B6)

3.2 Spermatogeneze

Spermatogeneze je proces, při kterém vznikají samčí pohlavní buňky (Phillips et al. 2010) a zahrnuje tři fáze; mitózu, meiózu a spermiogenezi (Hess a de Franca 2009). Na počátku tohoto procesu jsou spermatogoniální kmenové buňky, které lemují semenotvorný kanálek (Phillips et al. 2010) a jsou zásadní pro udržení spermatogeneze během života (de Rooij 2017). Rozlišujeme dva základní typy spermatogonií – A a B (Phillips et al. 2010). U spermatogonií typu B vzniká více heterochromatinu, který je u histologických řezů po nabarvení dobře viditelný (například DAPI¹ (Chazotte 2011)). Ze spermatogonií vznikají primární spermatocyty, ty projdou prvním meiotickým dělením, vzniknou sekundární spermatocyty, které projdou druhým meiotickým dělením (Phillips et al. 2010). Výsledkem druhého meiotického dělení jsou spermatidy, ze kterých procesem spermiogeneze vznikají spermie. U myší se spermie v průměru objevují 35. den po narození, u člověka mezi roky 11,7-15,3 (Picut et al. 2018).

Důležitá je teplota, během které spermatogeneze probíhá; u většiny savců nesmí přesáhnout 37°C (Griswold 2008); u myší je nejspíš vyšší teplota příčinou nižší četnosti CO (Zelazowski et al. 2017).



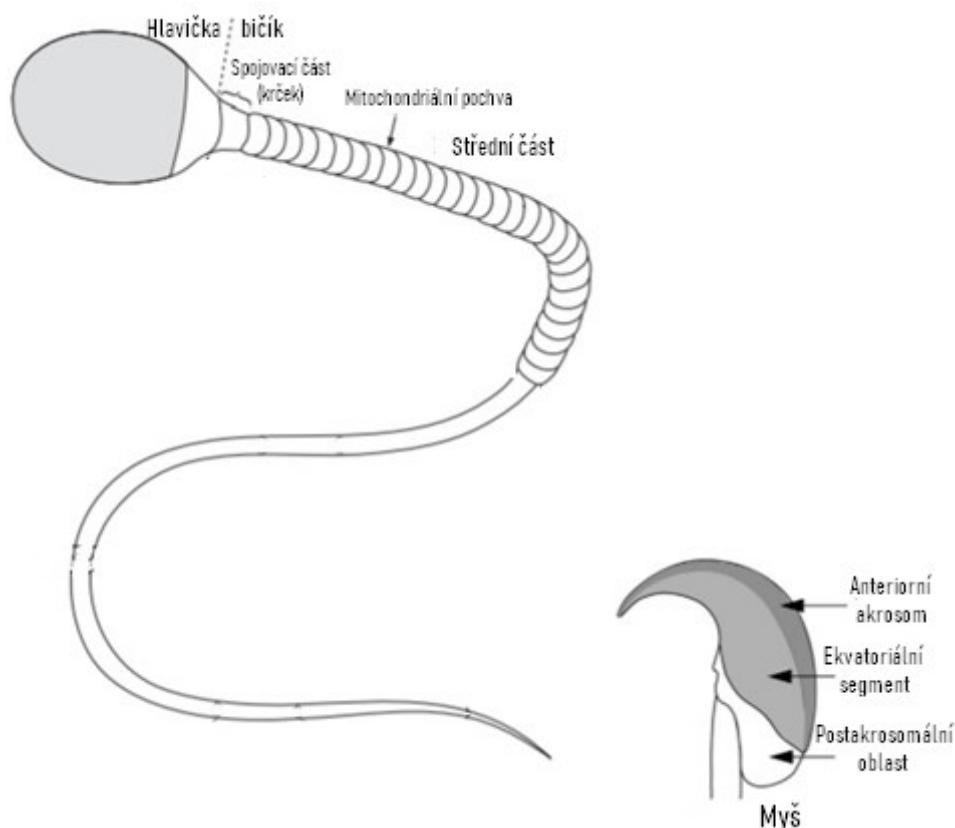
Obrázek č. 4: diferenciaci buněk během mitózy, meiózy a spermiogeneze (převzato a upraveno z Hess a de Franca 2009):

Spermatogonie (A, In, B), spermatocyty (PI: preleptotén, L: leptotén, Z: zygotén, P: pachytén, D: diakinéza, Mi: meiotické dělení), 1-8 kulaté spermatidy, 9-16 elongované spermatidy

¹ DAPI (4',6-Diamidin-2-fenylindol) je fluorescenční barvivo, které se váže v dvouvláknové DNA do malého žlábků v úsecích, které jsou bohaté na adenin a thymin; svojí vazbou umožňuje vizualizaci buněčného jádra (Chazotte 2011).

3.2.1 Morfologie zralé spermie

Mezi tvary spermií jednotlivých živočišných druhů je obrovská diverzita, což je dáno adaptací na prostředí, ve kterém oplodnění probíhá (Pitnick et al. 2009). Liší se jak v morfologii hlavičky, tak v délce a tvaru ocásku. Genetická informace je uložena v hlavičce spermie; na její špičce se nachází akrosomální váček, který obsahuje enzymy usnadňující průnik skrze extracelulární obaly oocyty a následnou fúzi s cytoplazmatickou membránou (Gerhard 2013). Pohyb je umožněn prostřednictvím bičíku, jehož hlavním proteinem je tubulin. Jako energetické jednotky slouží mitochondrie produkující ATP; uložené jsou ve střední části v mitochondriální pochvě. Pro myši, stejně jako pro ostatní hlodavce, je typický zahnutý zobáček u hlavičky spermie (Varea-Sanchez et al. 2016). Ačkoliv jeho přesná funkce nebyla přesně objasněna, asi je zde vztah mezi zahnutím a délkou zobáčku a rychlostí, jakou se spermie pohybuje během oplodnění (Varea-Sanchez et al. 2016).



Obrázek č. 5 a 6: všeobecná stavba savčí spermie a morfologie hlavičky u myší spermie (převzato z Toshimori a Eddy 2015)

3.3 Kyselina retinová a její úloha v procesu spermatogeneze

3.3.1 Význam

Pro savčí spermatogenezi je zásadní kyselina retinová, což je derivát vitamínu A (Clagett-Dame a Knutson 2011). V premeiotické fázi je důležitá pro přechod spermatogonií z nediferencovaného stavu na diferencovaný (Busada a Geyer 2016) a iniciaci meiózy (Endo et al. 2017). Sertoliho buňky indukují diferenciaci spermatogonií parakrinně prostřednictvím kyseliny retinové, zatímco meióza je řízena autonomně a kyselina retinovaná je syntetizována v premeiotických spermatocytech (Raverdeau et al. 2012). Dále se kyselina retinová uplatňuje i při procesu meiózy (Hogarth a Griswold 2013), konkrétně při iniciaci elongace spermatid a uvolnění spermií (Endo et al. 2017). Zdrojem kyseliny retinové jsou Sertoliho buňky a spermatocyty v pachyténu.

Svou vazbou v regulačních oblastech cílových genů kyselina retinová významně ovlivňuje genovou expresi (Clagett-Dame a Knutson 2011). Receptor pro kyselinu retinovou, RAR, je lokalizovaný v jádře a tvoří heterodimer s RXR, receptorem pro retinoid (Bowles a Koopman 2007). Společně se vážou na specifickou sekvenci DNA, která se nazývá RARE (retinoic acid response element) a ovlivňují tak po vazbě kyseliny retinové genovou expresi (Bowles a Koopman 2007; Clagett-Dame a Knutson 2011). V testes jsou exprimované tři základní typy RARs.

3.3.2 Syntéza

Kyselina retinová je syntetizována dvoukrokovou reakcí z vitamínu A (Duester 2008). První krok je reverzibilní a reakce se účastní dva enzymy: cytosolická alkohol dehydrogenáza a retinol dehydrogenáza. Během první reakce je retinol konvertován na retinaldehyd. V druhém kroku se uplatňuje retinaldehyd alkohol dehydrogenáza a dochází ke konverzi retinaldehydu na kyselinu retinovou.

4 Fertilita juvenilních jedinců

4.1 Vývoj testes během pohlavního dospívání

4.1.1 Vývoj testes u myši

U myši rozlišujeme čtyři fáze pohlavního dospívání; neonatální, infantilní, juvenilní a pubertální (Picut et al. 2018).

Neonatální období trvá přibližně sedm dní po narození. Během prvních dvou dnů jsou zde pouze gonocyty (Geyer 2017), spermatogonie typu A se objevují 3. den po narození (Geyer 2017) a 6. den mizí gonocyty (Picut et al. 2018). Po narození nastává 2. – 4. den „mini puberta“. Během této doby dochází přechodně ke zvýšení testikulárních hormonů a cytokinů; dochází k tomu v důsledku snížení mateřských pohlavních hormonů (estrogeny). Neonatální období je charakteristické migrací gonocytů k bazální membráně, proliferací a diferenciací ve spermatogonie. Zvýšená je i proliferace Sertoliho buněk. U novorozené myši jsou ve varleti přítomné pouze gonocyty a Sertoliho buňky (Bellve 1977; Kluin et al. 1982). Za počátek spermatogeneze se považuje doba, kdy se spermatogonie typu A začínají diferencovat a proliferují (Geyer 2017). Spermatogoniální diferenciace probíhá, stejně jako později u dospělých jedinců, asynchronně, kdy postupně dochází k diferenciaci v různých oblastech semenotvorného kanálku. Je to způsobeno tím, že jsou různé části semenotvorného kanálku vystaveny působení kyseliny retinové (viz kyselina retinová). Později během dospělosti vede asynchronní diferenciace ke stálé produkci spermií.

Během infantilního období, které trvá 8. – 20. den, dochází k masivní proliferaci spermatogonií, Sertoliho buněk a Leydigových buněk (Picut et al. 2018). Leydigovy buňky ještě nejsou dostatečně maturované, což má za následek nízkou hladinu testosteronu. Sertoliho buňky se přestávají dělit 17. den. Spermatocyty se zde mohou objevit, ale není to buněčný typ, který by v této fázi převažoval.

Juvenilní období probíhá od 21. do 32. dne (Picut et al. 2018). Během tohoto období začíná spermatogeneze, tzn. v kanálcích vidíme spermatocyty a spermatidy. Kulaté spermatidy jsou v tubulech přítomné 21. den, elongované spermatidy můžeme poprvé uvidět mezi dny 28–31.

Následuje pubertální období, které probíhá mezi dny 33–55 a je pro něj charakteristické zvýšení hladiny testosteronu, což je způsobené maturovanými Leydigovými buňkami. Spermie jsou v kanálcích viditelné nejdříve v průměru 35. den (Picut et al. 2018; Geyer 2017). Tento postnatální vývojový proces, kdy ze spermatogonií vznikají první spermie, se nazývá první vlna

spermatogeneze (Geyer 2017). První vlna začíná diferenciací spermatogonií a zahrnuje všechna buněčná stádia, kterými buňka během diferenciaci prochází; spermatogonie, spermatocyty, spermatidy a spermie. První vlna tedy začíná 3. – 4. den a končí 30. – 35. den.

Po pubertě následuje období časně dospělosti (Picut et al. 2018). Pro toto období je typické zvětšení velikosti testes, nadvarlat a zvýšené množství spermií. Mezi dny 70–77 dosahuje množství spermií přítomných v testes maximální hladiny; naopak klesat začíná mezi 10-15 měsíci (Dutta a Sengupta 2016).

Pro tvorbu spermií je důležitá také maturace Sertoliho buněk (Sharpe et al. 2003). Za maturaci se považuje diferenciaci „fetální“ buňky v „dospělou“. Maturace je proces, který zahrnuje následující kroky; Sertoliho buňky přestanou proliferovat, vytvoří se mezi nimi těsné spoje a změní se jejich genová exprese (Sharpe et al. 2003). Sertoliho buňky proliferují během neonatálního a infantilního období, dělit se přestávají 17. den (Picut et al. 2018). Kvůli roli Sertoliho buněk během spermatogeneze je důležité, aby dosáhly správného počtu. Jejich vývoj je ovlivněn hormonálně, konkrétně FSH, thyroidní hormony, růstový hormon a různé parakrinní růstové faktory (Sharpe et al. 2003).

4.1.2 Vývoj testes u člověka

Člověk stejně jako myš prochází neonatálním, infantilním, juvenilním a pubertálním obdobím, na rozdíl od myši ale má navíc „klidové období“, během kterého dojde k přerušení sekrece FSH, což má za následek výrazné zpoždění masivní proliferace Sertoliho buněk a spermatogonií (Geyer 2017; Picut et al. 2018), vývoj pokračuje až v pozdním juvenilním období (Picut et al. 2018). Toto dlouhé pozastavení procesu spermatogeneze je kontrolováno prostřednictvím endokrinních signálů, konkrétně testosteronem a FSH, jejichž sekrece se zvyšuje během puberty (Geyer 2017).

Neonatální období trvá 28 dní po narození a je charakteristické přítomností převážně gonocytů, Sertoliho buněk a v malém množství spermatogonií.

Následuje infantilní období, které trvá do dvou let. Během této doby Sertoliho buňky a spermatogonie téměř neproliferují, dochází ale k diferenciaci ve spermatogonie. Proliferaci nevykazují ani Leydigovy buňky lokalizované mezi semenotvornými kanálky s výjimkou „mini puberty“, kdy může dočasně dojít k nárůstu Leydigových buněk. Mini puberta u člověka nastává mezi 3. – 6. měsícem; dochází ke zvýšení testosteronu a LH (Picut et al. 2018). Je důležitá pro maskulinizaci mozku, správný růst vnějších genitálií, spermatogenezi a je podílí se na proliferaci zárodečných buněk během prvních 100 dní po narození.

Další fází je juvenilní období, které trvá do 11. roku života. Většina této fáze je klidová; Sertoliho buňky ani spermatogonie nevykazují výraznou proliferaci. Mezi 3. – 4. rokem se objevují primární spermatocyty v preloptoténu, které jsou morfologicky podobné gonocytům. Dál meióza ale nepokračuje, protože Sertoliho buňky v této fázi ještě nejsou maturované a není zde formovaná bariéra mezi testes a krví. Dochází ale k nárůstu spermatogonií, Leydigových buněk a zvětšení testes. Na konci juvenilní fáze (9.-11. rok) dochází k masivní proliferaci spermatogonií a Sertoliho buněk.

Následuje pubertální období (12. – 14. rok), kdy dochází k prudkému nárůstu hladin testosteronu v důsledku zvýšení množství zralých Leydigových buněk. Sertoliho buňky maturují mezi 12. a 13. rokem. Spermie se začínají objevovat v průměru mezi roky 11,7 – 15,3.

	Myš	Člověk
Neonatální období	0 - 7. den	0-28. den
<i>Přítomný buněčný typ</i>	Sertoliho buňky, gonocyty, spermatogonie	
Infantilní období	8. - 20. den	29. den - 2 roky
<i>Které buňky se objevují</i>	Spermatocyty	-
Juvenilní období	21. - 32. den	3 - 11 let
<i>Které buňky se objevují</i>	Spermatocyty, spermatidy	
Pubertální období	33. - 55. den	12. - 14. rok
<i>Které buňky se objevují</i>	Spermie	
Maximální hladina spermií v testes	70. - 77. den	3 roky po začátku puberty
Maturace Sertoliho buněk	17. den	12. - 13. rok
Sestup testes	postnatálně	prenatálně
Největší proliferace spermatogonií a Sertoliho buněk	5. - 15. den	9. - 11. rok
"Klidové" období	není	3. - 9. rok
"Mini puberta"	2. - 4. den	3-6 měsíců

Tabulka č. 1: průběh dospívání u myši a člověka (informace převzaty z Picut et al. 2018)

4.2 Vliv absence kyseliny retinové na diferenciaci spermatogoniálních kmenových buněk

U juvenilních jedinců je pro proces spermatogeneze zásadní přítomnost retinol dehydrogenázy 10, která se uplatňuje při syntéze kyseliny retinové (Tong et al. 2013). Hlavním zdrojem tohoto enzymu jsou Sertoliho buňky. Pokud buňky retinol dehydrogenáza 10 nemají, u mláďat dojde k zastavení spermatogoniální diferenciace, podobně jako u zvířat s nedostatkem vitamínu A. U dospělých jedinců při absenci retinol dehydrogenázy 10 spermatogeneze fenotypově probíhá normálně; nejspíš využívají jiný zdroj kyseliny retinové.

4.3 Průběh první vlny spermatogeneze

Savčí spermatogeneze během reprodukčního období probíhá prostřednictvím diferenciací spermatogonií, které udržují svůj stálý počet mitotickým dělením (Griswold 2016; Hess a de Franca 2009). Vlna je definovaná jako doba od zahájení diferenciace spermatogonie až do vzniku maturované spermie (Griswold 2016). První vlna spermatogeneze je ale specifická tím, že spermie vznikají přímo z gonocytů a ne spermatogonií (Geyer 2017; Yoshida 2006); tyto spermie se objevují u myší starých 35 – 50 dní (Geyer 2017). Spermie odvozené přímo z gonocytů umožňují samcům být fertilní během kratší doby. Diferenciace probíhá asynchronně; postupná diferenciace během první vlny spermatogeneze vede k tomu, že epitel je u dospělých jedinců tvořen buňkami v různých fázích, což umožňuje efektivnější regulaci genové exprese, protože různé fáze buněčného vývoje mohou být vystaveny působení různých morfogenů a hormonů a kromě toho dochází ke kontinuální produkci spermií (Griswold 2016; Geyer 2017). U druhů rozmnožujících se sezónně dochází k první vlně spermatogeneze na začátku každého reprodukčního období (Geyer 2017). Mimo období páření jsou v semenotvorných kanálcích přítomné převážně Sertoliho buňky, spermatogonie a někdy v menším množství spermatocyty; hladina testosteronu je během této doby snížena. Doba, kdy dochází k páření, se liší mezi jednotlivými druhy a je ovlivněna zeměpisnou šířkou; sezónní páření je načasované tak, aby potomci měli po narození co nejlepší podmínky pro přežití.

Během první vlny spermatogeneze je u myší oproti spermatogenezi probíhající u starších jedinců nižší četnost rekombinace prostřednictvím CO (viz rekombinace) (Vrooman et al. 2014).

U myší probíhá první vlna spermatogeneze za odlišných podmínek; testes ještě zcela nesestoupily, takže spermatogeneze probíhá při 37°C (Vrooman et al. 2014). Po sestupu testes

je teplota přibližně 33°C. Dále je první vlna spermatogeneze podpořena Sertoliho buňkami, které ještě nejsou maturované (Vrooman et al. 2014).

Buněčný typ	Kdy se buňky objevují v tubulech (dny)
Spermatogonie typu A	2-3
Spermatogonie typu B	4-5
Spermatocyty v preleptoténu	8
Spermatocyty v leptoténu	10
Spermatocyty v zygoténu	12
Spermatocyty v pachyténu	14
Kulaté spermatidy	20
Elongované spermatidy	24
Spermie	30-35

Tabulka č. 2: doba, kdy se u myši po narození začínají objevovat jednotlivé buněčné typy (data převzata z Griswold 2016)

To, jak jsou pohlavní buňky z první vlny spermatogeneze fertilní, se snažili ve svojí studii objasnit Miki et al. (2004), kdy prostřednictvím mikroinseminace oplodnili oocyty kulatými spermatidami z první vlny spermatogeneze. Ve svém pokusu použili myší samce ve věku 17 – 25 dní a porovnali je s výsledky mikroinseminace kulatými spermatidami dospělých samců. Mikroinseminace neboli intracytoplazmatická injekce (ICSI) je technika, pomocí které je spermie či spermatida injikována prostřednictvím speciálních zařízení přímo do cytoplazmy chemicky aktivovaného oocyty (Ogura et al. 2001) a v současné době bývá běžně používána jako jedna z metod umělého oplodnění u savců včetně lidí (Kaneko 2015). Tato metoda je užitečná, pokud má spermie problémy s motilitou nebo nedokáže proniknout obaly oocyty. Tabulka č. 3 níže znázorňuje embryonální vývoj od doby, kdy byla kulatá spermatida injikována do oocyty. Po mikroinseminaci došlo k úspěšnému oplodnění 80-90 % oocytů (Miki et al. 2004). Další fázi, rýhování, která vede ke vzniku moruly/blastuly prošlo 60-85 %. Po přenosu do vejcovodu nebo dělohy se množství snížilo na 20-35 %, v této fázi ještě bez ohledu na stáří samců, ze kterých byly spermatidy odebrány. Procentuální zastoupení narozených potomků, které vznikly mikroinseminací spermatidou z velmi mladých samců bylo velmi nízké (0,9 %), u dospělých byla úspěšnost několikanásobně vyšší (18,5 %). Ačkoliv juvenilní samci neměli příliš vysokou úspěšnost, dvě samice, které se vyvinuly z embrya po inseminaci spermatidou sedmnáctidenního samce, se vyvinuly ve zdravé fertilní samice. Některé spermatidy odvozené z první vlny spermatogeneze jsou tedy schopné po injekci do cytoplazmy oplodnit aktivovaný

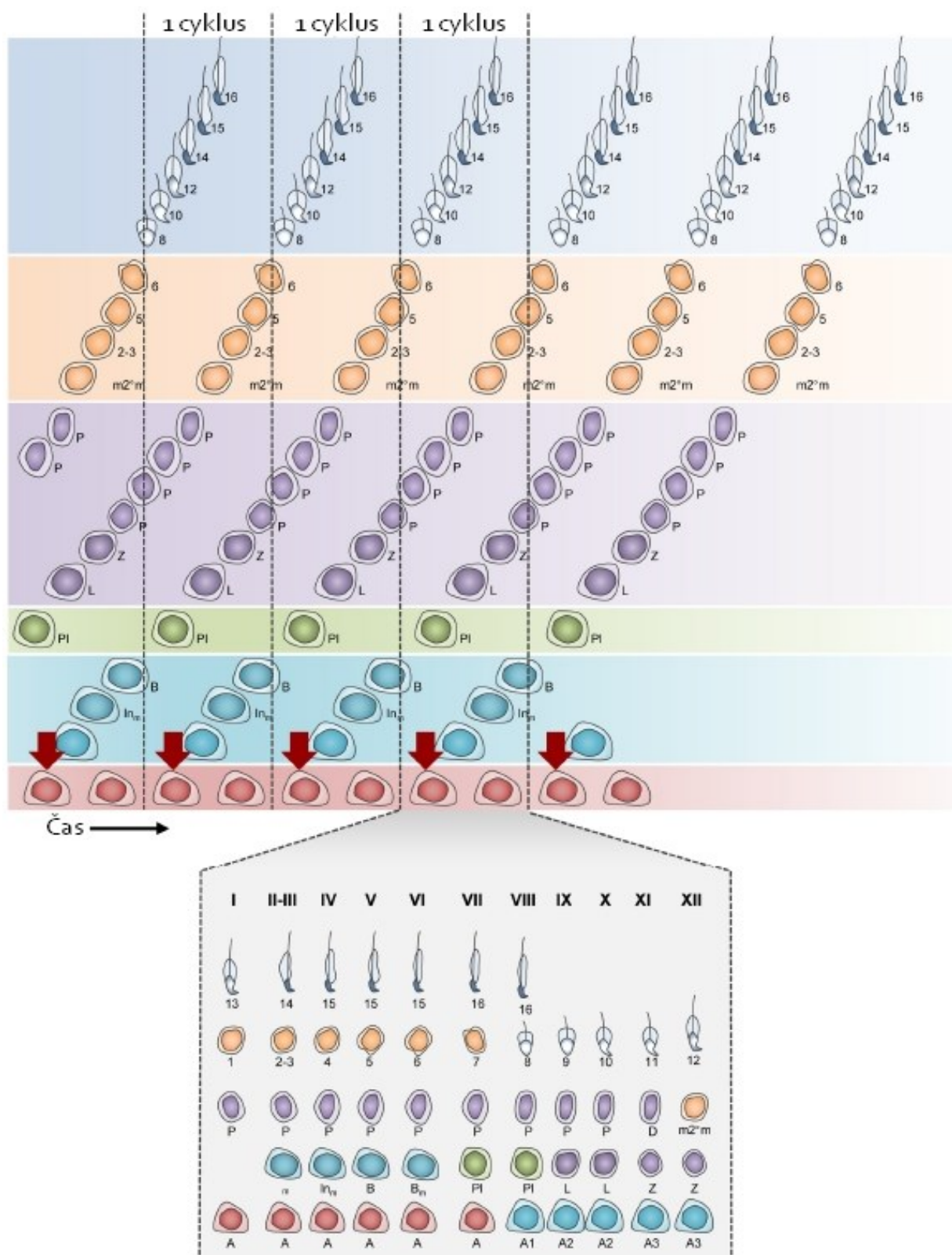
oocyt, ale pokud se podíváme na efektivitu, s klesajícím věkem se snižuje. Není jasné, zda nízká úspěšnost oplodnění spermatidou juvenilních samců byla u této studie způsobena biologickou nebo technickou chybou. Inseminace spermatidami z první vlny spermatogeneze by mohla výrazně ušetřit čas. Běžně jednotlivé generace dělí tři měsíce; myši se začínají pářit přibližně po 8 týdnech, další 3 týdny trvá gravidita (Ayadi et al. 2011). Pokud by se použily oocyty z prepubertálních samic ve věku 25-30 dní a spermatidy z první vlny spermatogeneze (podobně staří samci), generační doba by se snížila na 45-50 dní.

Vývoj embrya in vitro a in vivo po mikroinseminaci kulatou spermatidou				
Věk samců (dny)	Oocyty, které po inseminaci formovaly pronucleus (%)	Stádium moruly/blastuly (%)	Uhnížděná vajíčka (%)	Plody (%)
Dospělí	93	75,5	31,5	18,5
25	83,8	63,1	12,2	14,6
24	97,5	85,5	14,7	13,2
23	94,5	82,1	34,6	15
22	86,8	82,8	14,4	8
21	82,9	60	22	8
20	91,6	66,8	20,4	10,2
19	92,1	70,9	16,3	7,9
18	77,8	59,3	25	4,2
17	88	59,6	19,4	0,9

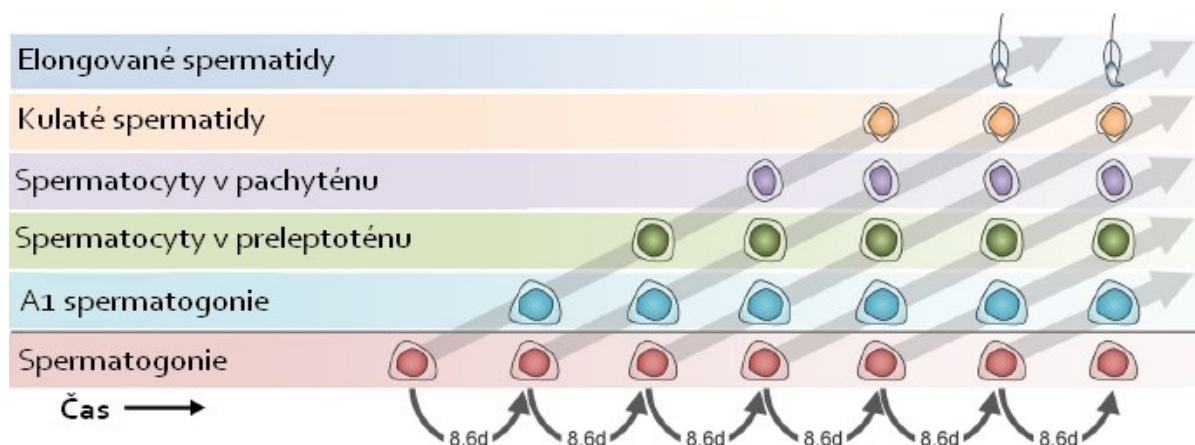
Tabulka č. 3: procentuální úspěšnost embryonálního vývoje po mikroinseminaci oocyty kulatou spermatidou z první vlny spermatogeneze (převzato a upraveno Miki et al. 2004)

4.4 Rychlost diferenciacie spermatogoniálních kmenových buněk

Spermatogeneze je proces, během kterého vznikají spermie; zahrnuje diferenciaci kmenových buněk, spermatogonií, po které následuje meiotické dělení (Griswold 2016). Ve studii Kluin et al. (1982) prokázali, že u juvenilní myši trvají jednotlivé cykly kratší dobu, takže za daný časový úsek dospěje buněčný vývoj dále. Cyklus je definovaný jako časový úsek mezi jednotlivými iniciacemi diferenciacie spermatogonií (Griswold 2016). U myši ve věku 10–30 dní trval jeden cyklus (viz obrázek) v průměru $7,42 \pm 0,07$ dní (Kluin et al. 1982). S věkem se doba postupně zvyšovala, přičemž u dospělých myší jednotlivé cykly trvaly v průměru $8,6 \pm 0,14$ dní.



Obrázek č. 7 (převzato a upraveno z Griswold 2016): grafické znázornění jednotlivých cyklů během spermatogeneze

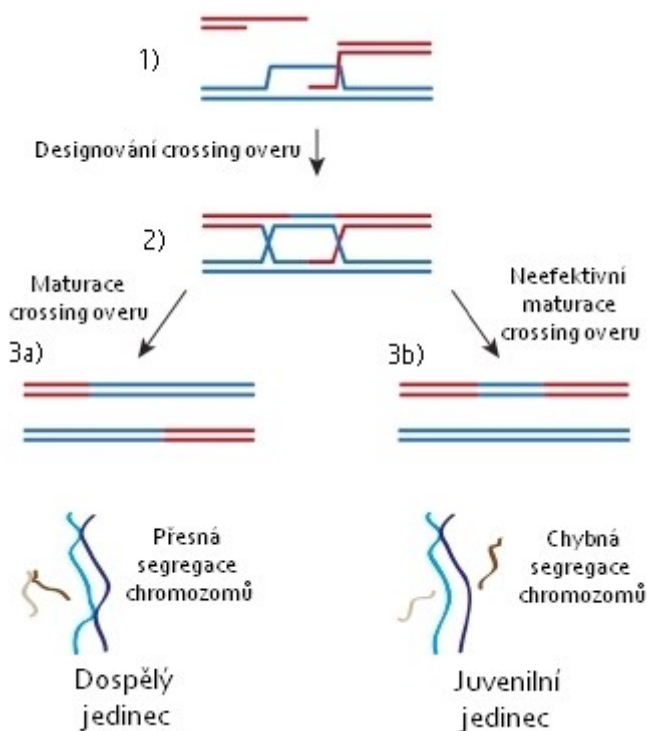


Obrázek č. 8: šikmé šipky znázorňují jednotlivé vlny a buněčná stádia, která každá vlna zahrnuje; u spermatogonií je znázorněna iniciace jednotlivých cyklů (u dospělců v průměru každých 8,6 dnů) (převzato a upraveno Griswold 2016)

4.5 Meiotická homologická rekombinace během prvních tří vln spermatogeneze

Rekombinace je proces, který vede k výměně genetické informace (Alberts et al. 1998). Během života je variabilní; bylo prokázáno, že četnost rekombinace během první vlny spermatogeneze je nižší oproti starším jedincům (Vrooman et al. 2014). Rekombinace prostřednictvím CO je zásadní pro správný průběh meiózy; pro úspěšnou segregaci je nutné, aby každý pár homologů měl alespoň jeden CO (Zelazowski et al. 2017).

Během doby, kdy jsou v buňce formovány CO, jsou u juvenilních jedinců více využívány cesty zahrnující strukturně specifické nukleázy vedoucí ke vzniku NCO (Zelazowski et al. 2017).

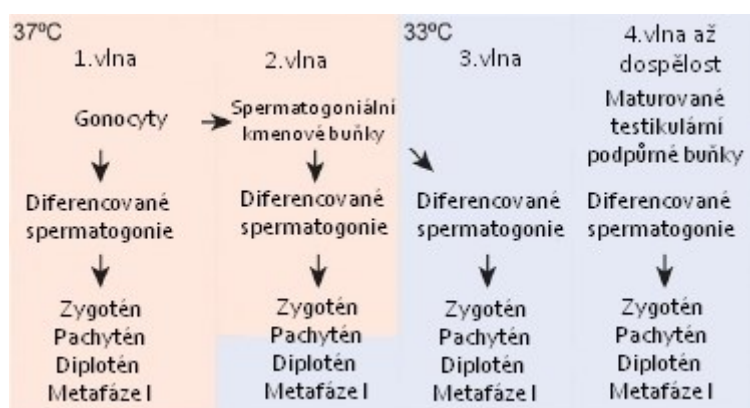


Obrázek č. 9: CO vs NCO (převzato a upraveno z Zelazowski et al. 2017)

- 1) Nejprve dojde na jednom vlákně k dvouvláknovému zlomu (zde červené vlákno) a 3' konec jednoho vlákna (nesoucí DMC1/RAD51) je naveden do druhého dosud neporušeného (modré vlákno)
- 2) Vznikne dvojitá Hollidayova struktura
- 3) Podle toho, na kterých místech je vlákno štěpeno, buď dojde (3a: pomocí MLH1/MLH3 na CO) nebo nedojde (3b: jiné nukleázy) k výměně vlákna mezi nesesterskými chromatidami

Zelazowski et al. (2017) porovnávali meziproducty vznikající během profáze I u juvenilních a dospělých samců prostřednictvím izolace spermatocytů a počítání fluorescenčně barvených míst výskytu proteinů uplatňujících se v homologické rekombinaci během profáze I; přišli na to, že ke změně ve zpracování meziproductů rekombinace dochází v pachyténu potom, co je v zygoténu navázán na DNA komplex RAD51/DMC1; dokazuje to nižší četnost míst RPA2 u juvenilních jedinců. RAD51 a DMC1 jsou proteiny objevující se v leptoténu; jsou součástí nukleoproteinových komplexů, které jsou důležité pro párování homologických chromozomů (Plug a Ashley 1998; Tarsounas et al. 1999). RPA2 je homolog RPA; je to protein přítomný v zygoténu a časném pachyténu; je tedy důležitý jak pro párování homologických chromozomů, tak pro rekombinaci (Plug a Ashley 1998; Ribeiro et al. 2016). U druhé vlny spermatogeneze byla četnost RPA2 srovnatelná s první vlnou, až u třetí vlny byly výsledky srovnatelné s dospělými jedinci. Nižší četnost RPA2 znamenala také nižší celkovou rekombinaci.

Dále byla snižená četnost MLH1 míst; pouze 33% spermatocytů z první vlny spermatogeneze mělo MLH1 na všech bivalentech (Zelazowski et al. 2017). MLH1 je přítomný v časném a středním pachytému (Plug a Ashley 1998); je to protein zásadní pro správný průběh crossing overu a vznik chiazmat (Baker et al. 1996). Frekvence CO souvisí s délkou chromozomů (Hunter 2015), takže univalentní byly krátké autozomy a pohlavní chromozomy; u těch je oblast rekombinace omezena na krátký homologický úsek PAR (Zelazowski et al. 2017). Frekvence byla snižená během druhé i třetí vlny, což naznačuje, že je třetí kolo jakýmsi přechodem mezi mláďaty a dospělci ve zpracování CO/NCO meziproduktů.



Obrázek č. 10: schéma prvních vln spermatogeneze (převzato a upraveno z Zelazowski et al. 2017)

Nižší četnost CO vede k achiazmatickým chromozomům, což může mít za následek nesprávnou distribuci chromozomů do postmeiotických buněk (viz disociace chromozomů) (Zelazowski et al. 2017). Chybná distribuce chromozomů vede k různým aneuploidiím, nabízí se tedy otázka, zda je u juvenilních myší i vyšší četnost aneuploidií. Dostupná data (Zelazowski et al. 2017; Vrooman et al. 2014) sice ukazují nižší četnost rekombinace během prvních tří vln spermatogeneze, zároveň ale bylo potvrzeno, že meiotické chyby jsou eliminovány během meiotických kontrolních bodů, takže synaptické defekty, které jsou viditelné v profázi I, nejsou přítomné v metafázi II (Vrooman et al. 2014).

Rozdíly ve frekvenci MLH1 míst mezi juvenilními a dospělými jedinci byly pozorovány i u lidí; u dvou mužů ve věku 15 a 16 let² bylo v průměru o 30 % MLH1 méně oproti dospělým (Zelazowski et al. 2017). Juvenilní muži měli na rozdíl od myší delší synaptonemální komplex ve srovnání s dospělými muži. U mladých otců je tedy, nejspíš jako následek

² Spermatogeneze u člověka začíná mezi roky 11,7 – 15, 3; jedna vlna u trvá 64 dní a jednotlivé cykly začínají každých 16 dní (Picut et al. 2018); u patnáctiletého muže se tedy mohlo jednat o jednu z prvních vln spermatogeneze. Abychom ale mohli s přesností určit, o kolikátou vlnu se jedná, museli bychom znát věk, u kterých u obou mužů spermatogeneze začala.

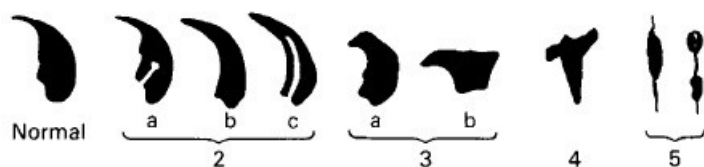
neefektivní maturace CO a absence chiazmat, vyšší šance špatné distribuce chromozomů do postmeiotických buněk (Steiner et al. 2015).

4.6 Malformace spermií a ovlivnění věkem myši

U mláďat nacházíme odlišnosti od dospělců i v morfologii spermií; u nematurovaných jedinců byla vyšší jak četnost malformovaných spermií, tak i závažnost malformací (Krzanowska 1981). V této studii (Krzanowska 1981) byly analyzovány spermie různě starých samců (viz tabulka níže). Spermie byly získány ze zabitých samic po kopulaci; poté byly zafixovány alkoholem a nabarveny eosinem. U každého samce bylo analyzováno 200 spermií a byly vyhodnoceny jednotlivé malformace; spermie se vyhodnocovaly u samců starých 6, 7, 8 a 10 týdnů (v tabulce níže jsou pro srovnání juvenilních a dospělých jedinců uvedeny samci ve věku 6 a 10 týdnů). Závažnost malformací byla posuzována podle odchylky od „normální morfologie“; rostla vzestupně s jednotlivými typy malformací. Zatímco u dospělých jedinců je četnost malformovaných spermií ovlivněna genetickým pozadím, u samců starých 6 týdnů (1. vlna spermatogeneze) nacházíme abnormality ve tvaru hlavičky spermie napříč různými kmeny. Během maturace se následně četnost deformovaných spermií rapidně snížila. Dále byl u nematurovaných jedinců (6-8 týdnů) pozorovaný inverzní vztah mezi tělesnou hmotností a závažností abnormalit. Z níže zobrazených malformací (obr. 11) byl mezi mláďaty nejčastější typ č. 5, jehož četnost se s věkem snižovala (Krzanowska 1981). Četnost spermií s malformovanou hlavičkou se snižovala až do 10. týdne, kdy se množství spermií se zdravou morfologií ustálilo. Přesné zastoupení viz tabulka.

			Malformované spermie (%)							
			2			3				
Kmen	Věk (týdny)	Spermie s normální morfologií (%)	a	b	c	a	b	4	5	Téměř normální
CBA	6	21,3	1,2	0,3	2,2	9,7	5,8	7,7	28,9	22,9
	10	93,2	0,6	0,0	0,7	2,1	1,2	1,2	0,4	0,7
C57	6	2,8	0,0	0,0	0,0	6,6	10,2	38,4	34,4	7,6
	10	82,2	0,1	0,4	0,0	5,2	5,8	3,6	0,6	2,8
KE	6	2,7	0,2	1,2	1,5	13,2	10,8	34,0	34,3	2,2
	10	79,5	1,9	1,1	5,3	5,4	1,7	2,6	0,0	2,4

Tabulka č. 4: zastoupení zdravých spermií a konkrétních malformací specifikovaných v obr. níže u myších samců ve věku 6 a 10 týdnů (převzato a upraveno z Krzanowska 1981)



Obrázek č. 11: malformace hlaviček spermií (převzato z Krzanowska 1981)

4.7 Disociace chromozomů

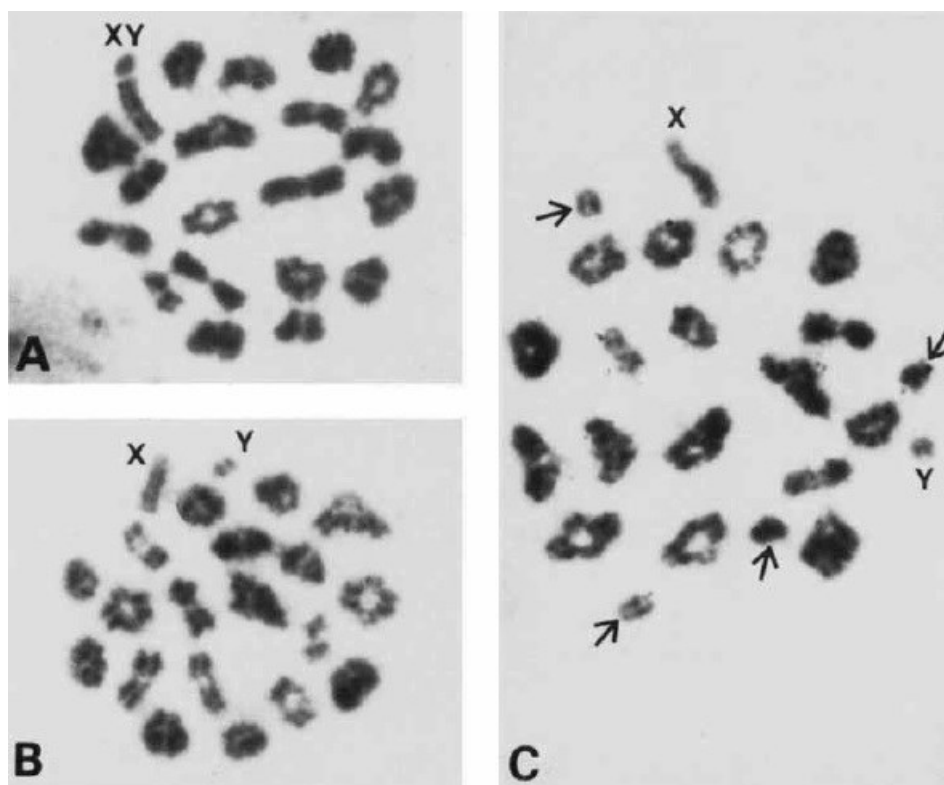
4.7.1 Myš

Pohlavní chromozomy jsou náchylnější na chyby při segregaci; je to kvůli tomu, že místo, kde dochází k rekombinaci a vzniku chiazmat, je omezeno na pseudoautozomální oblast, což je krátká oblast homologie mezi chromozomy X a Y - u myši jen stovky kilobází (Faisal a Kauppi 2016). U dospělých jedinců se frekvence spontánních disociací X-Y chromozomu lišila podle daného kmene (Matsuda et al. 1982; Krzanowska a Wabik-Sliz 1994). Stejně tomu bylo i u mláďat; u dvou studií (Krzanowska 1989; Vrooman et al. 2014), ve kterých porovnávali četnost univalentů X a Y juvenilních a dospělých jedinců, získali odlišné výsledky. V tabulkách níže jsou konkrétní kmeny, které byly v daných studiích použity a četnost X-Y univalentů. Ve studii (Krzanowska 1989) ukázali, že juvenilní samci jsou náchylnější na disociaci X a Y chromozomu v diakinézi-metafázi I. V další studii (Vrooman et al. 2014), kde byly použity úplně jiné kmeny, došli k závěru, že v pachyténu se četnost X-Y univalentů zvyšuje s věkem. Z odlišných výsledků těchto studií vyplývá, že frekvence univalentů je ovlivněna genetickým pozadím nejen u dospělých jedinců, ale i u juvenilních, bylo by to třeba ale potvrdit použitím stejných kmenů a sledovat, jak pachytén tak diakinézi-metafázi I. U (Krzanowska 1989) byl u juvenilních samců lehce zvýšený výskyt univalentních autozomů, ne však tak častý jako v případě pohlavních chromozomů.

Frekvence univalentů v pachytému		
Kmen	Věk	X-Y univalenty (%)
B6	20 dní	1,7
	12 týdnů	3
	1 rok	2,5
C3H	20 dní	0
	12 týdnů	0
	1 rok	2
CD1	20 dní	0,6
	12 týdnů	1,3
	1 rok	4

Frekvence univalentů v diakínězi-metafázi I			
Kmen	Věk	X-Y univalenty (%)	Univalentní autozomy (%)
CBA	3-6 měsíců	28,8±7,34	4,5±1,72
	29 dní	37,3±12,64	7,2±3,9
KP	3-6 měsíců	11,0±4,52	4,6±2,94
	28 dní	23,9±7,39	8,6±2,8
C57	3-6 měsíců	7,2±3,37	1,3±1,06
	27 dní	9,5±3,25	2,9±3,07
KE	3-6 měsíců	6,8±6,18	2,3±1,67
	27 dní	16,7±7,1	2±1,26

Tabulka č. 5 (data převzata z tabulky Vrooman et al. 2014) a tabulka č. 6 (data převzata z tabulky Krzanowska 1989)



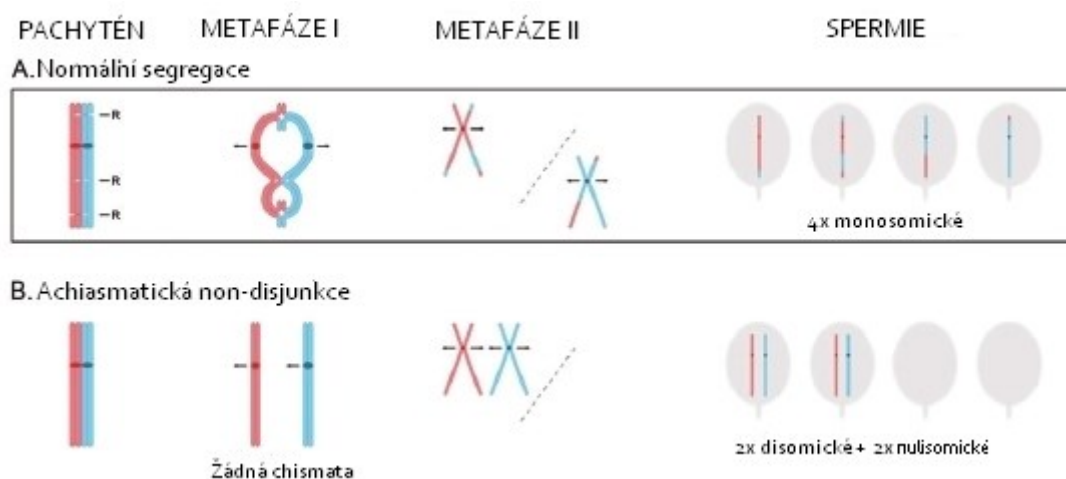
Obrázek č. 12: roztěry chromozomů v diakínězi (převzato z Krzanowska 1989): A – normální spermatocyty, XY bivalenty; B – X a Y chromozomy jsou disociované; C – X, Y chromozomy a dva páry autozomů (označeno šipkami) jsou disociované

Přítomnost univalentů během profáze I ale nemusí vždy znamenat problém z hlediska fertility; ve své studii Vrooman et al. (2014) zkoumali metafázi II stejných samců, u kterých byly pozorovány synaptické defekty během profáze I. Předpokládali, že kontrolní body by měli spustit zástavu meiózy plus apoptózu v buňkách s defekty, a k tomu nejspíš došlo, protože zaznamenali např. snížená procenta aneuploidních buněk v metafázi II ve srovnání s metafází I.

4.7.2 Genetické vady jako důsledek disociace chromozomů u lidí

Z dostupných dat (Vrooman et al. 2014) vyplývá, že u myší jsou buňky s chybně segregovanými chromozomy eliminovány během kontrolních bodů v meióze; u lidí, konkrétně u mladých otců, tyto kontrolní body ve srovnání s dospělci častěji selhávají (Templado et al. 2013). Špatná distribuce chromozomů do buněk, nondisjunkce, vést k různým aneuploidiím; postmeiotické buňky pak mají o jeden chromozom méně či více, jsou tedy dizomické či nulizomické, viz obrázek níže (Templado et al. 2013; Zelazowski et al. 2017). Aneuploidie mohou být mateřského i otcovského původu; častější jsou aneuploidie pohlavních chromozomů než autozomů (Templado et al. 2013). Trizomie XYY je vždy otcovského původu, trizomie XXY je otcovského původu v 50 %; monozomie chromozomu X je důsledkem meiotických chyb u otce v 70 % - 80 % případů (Templado et al. 2013 a literatura zde citovaná). Většina autozomálních aneuploidií je letální; se životem jsou slučitelné trizomie 13 (Patauův syndrom), 18 (Edwardsův syndrom) a 21 (Downův syndrom).

Ačkoliv je velmi dobře známo, že se zvyšujícím se věkem rodičů se zvyšuje i riziko aneuploidií, ukázalo se, že u všech tří aneuploidií autozomálního původu je zvýšené riziko i pro mladé otce (Steiner et al. 2015). Například pokud matce bylo 35 let a otci 20 let, riziko aneuploidie bylo dvakrát vyšší, než kdyby otci bylo 40 let. U předchozích studií bylo prokázáno vyšší riziko Downova syndromu u mladých otců (publikace citované u Steiner et al. 2015), novější studie (Steiner et al. 2015) ale jasně ukazuje zvýšené riziko i pro trizomie chromozomu 13 a 18. Zvýšené riziko těchto aneuploidií je u juvenilních otců přibližně dvakrát vyšší než u dospělých mužů.



Obrázek č. 13: mechanismus nondisjunkce (chyba v rozchodu homologických chromozomů) během samčí meiózy u člověka (převzato a upraveno z Templado et al. 2013)

A. Normální segregace meiózy

B. Achiasmatická nondisjunkce, během které dochází v důsledku absence chiazmat k náhodné segregaci dvou homologických chiazmat

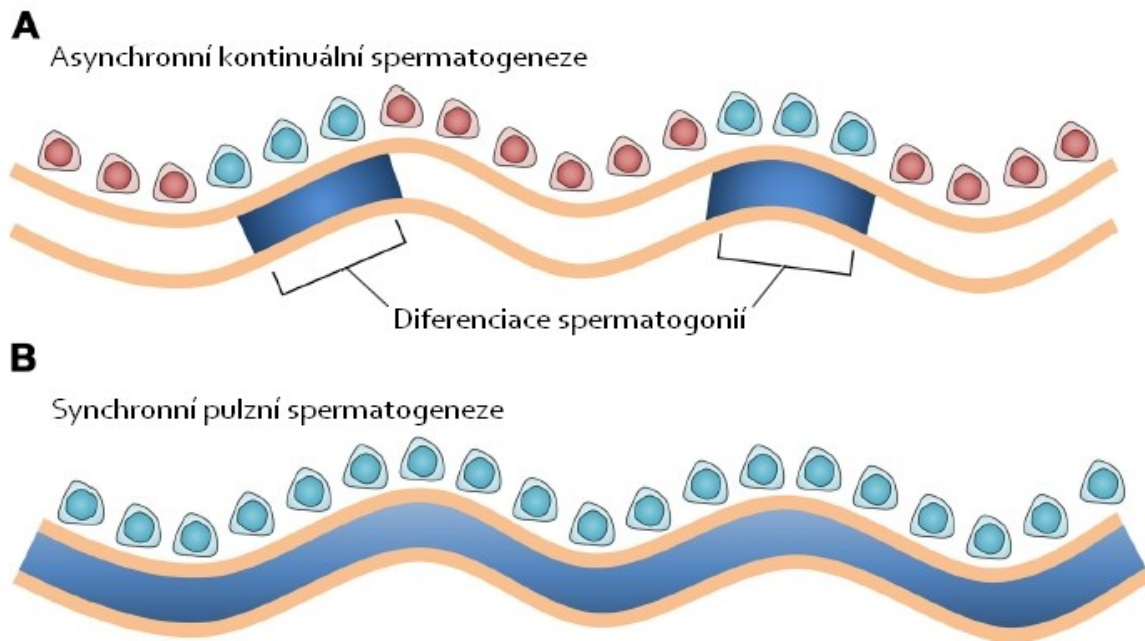
5 Využití juvenilních samců

Juvenilní myší samci se často využívají pro studium jednotlivých fází buněčného vývoje během spermatogeneze. Zkoumat jednotlivé fáze v testes dospělých jedinců je obtížné z toho důvodu, že se v nich nachází všechna buněčná stádia spermatogeneze, proto se například pro izolaci spermatogonií, Sertoliho buněk, buněk v preleptoténu, v leptoténu a zygoténu, v pachyténu využívají juvenilní samci; zabraňuje to kontaminaci dalšími buněčnými typy (spermatidy nebo spermie) a dosáhne se tak vyšší čistoty (Bellve 1977). Nejprve se vyzolují semenotvorné kanálky, připraví se buněčná suspenze, poté se požadované buňky oddělují například prostřednictvím sedimentace a na základě jejich morfologických vlastností se získané buňky charakterizují; podrobná metodika je popsána např. v (Bellve 1977). Úspěšnost pro jednotlivé buněčné typy byla následující: primitivní spermatogonie typu A 90 %, spermatogonie typu A 91 %, spermatogonie typu B 76 %, spermatocyty v preleptoténu 93 %, spermatocyty v leptoténu a zygoténu 31 % a 21 %, spermatocyty v pachyténu 89 %, Sertoliho buňky 99 %.

Buněčný typ	Dny po narození							
	6	8	10	12	14	16	18	20
Primitivní spermatogonie typu A	16	-	-	-	-	-	-	-
Spermatogonie A	-	17	7	7	6	9	3	4
Spermatogonie B	-	10	11	8	6	8	7	6
Spermatocyty v preleptoténu	-	-	15	11	9	5	10	7
Spermatocyty v leptoténu	-	-	15	12	13	5	5	9
Spermatocyty v zygoténu	-	-	-	23	14	7	8	8
Spermatocyty v pachyténu	-	-	-	-	15	27	36	33
Sekundární spermatocyty	-	-	-	-	-	-	1	1
Kulaté spermatidy	-	-	-	-	-	-	1	4
Sertoliho buňky	84	73	52	39	37	39	29	28

Tabulka č. 7: přehled přesného zastoupení jednotlivých buněčných typů u různě starých myší, jednotlivá zastoupení jsou vyjádřena v procentech; zastoupení jednotlivých buněk bylo určeno příčným řezem testes; pro každé stáří byly použity tři myši a bylo vyhodnoceno 50 řezů (tabulka převzata z Bellve 1977)

Se zajímavou metodou podrobného studia jednotlivých buněk přišli Romer et al. (2018), kteří dosáhli lepší synchronizované diferenciaci spermatogonií a dokázali pak lépe izolovat buňky od nediferencovaných spermatogonií až po pozdní profázi I. Tato metoda na rozdíl od předchozích zajišťuje vyšší výtěžek a čistotu; obzvláště u spermatocytů v leptoténu a zygoténu, u nichž byl výtěžek u předchozích metod velmi nízký (31 % a 21 %). Tato metoda využívá pozorování, že při absenci kyseliny retinové dojde k zastavení buněčné diferenciaci a spermatogonie se dál nediferencují. Pokud poté dojde jednorázově k podání kyseliny retinové, spustí se diferenciaci spermatogonií, takže spermatogeneze probíhá synchronně ve všech kanálcích celých testes po dobu několika měsíců. Tuto metodu nazvali „3S“ (z anglického jazyka = synchronize, stage, and sort). Po první fázi, synchronizaci spermatogeneze, je nutné podrobné histologické zkoumání, které umožní určit přesné stádium a složení jednotlivých buněčných typů (staging) v závislosti na genetickém pozadí. Poslední fází je izolace konkrétního buněčného typu (sorting – třídění). Výtěžek této izolační metody byl přibližně 90 % u všech buněčných typů včetně spermatocytů v leptoténu a zygoténu.



Obrázek č. 14 (převzato a upraveno z Griswold 2016):

- A) Asynchronní spermatogeneze, při které je iniciovaná diferenciace v danou chvíli pouze na určitých místech. Modře jsou značené diferencující se spermatogonie.
- B) Synchronní spermatogeneze, při které dochází k diferenciaci všech kmenových buněk zároveň

6 Závěr

Cílem této práce bylo shrnout dosavadní poznatky o spermatogenezi juvenilní myši a jejich případné využití. Maturace testes juvenilních myši včetně jednotlivých vln spermatogeneze je velmi dobře popsána. U spermatogeneze dojde po narození nejprve k diferenciaci gonocytů ve spermatogonie. Ty si poté udržují svůj stálý počet mitotickým dělením a pravidelně, vlivem kyseliny retinové, dochází k jejich diferenciaci. U první vlny spermatogeneze jsou spermie odvozeny přímo z gonocytů dříve, než se gonocyty diferencují ve spermatogonie. Ve druhé vlně spermatogeneze už spermie vznikají postupnou diferenciací ze spermatogonií, stejně jako je tomu u následujících vln. Nižší četnost rekombinace prostřednictvím CO je patrná u první, druhé i třetí vlny. Ačkoliv se četnost rekombinace v průběh jednotlivých vln zvyšuje, až čtvrtá vlna, kdy jsou maturované testikulární podpůrné buňky, je v četnosti rekombinace srovnatelná s dospělými jedinci. Ke změně dochází v pachytému; důkazem je nižší četnost proteinů RPA2 a MLH1, které jsou přítomné právě během pachytému a jejich hlavní role je párování homologických chromozomů a rekombinace prostřednictvím CO.

CO není pouze proces vedoucí k výměně genetické informace, nýbrž má důležitou úlohu i při segregaci chromozomů do postmeiotických buněk. CO generuje chiazmata, spoje, které drží pohromadě homologické nesesterské chromatidy během meiózy. Tyto spoje jsou důležité pro seřazení chromozomů do ekvatoriální roviny během metafáze a následný rozchod do dceřiných buněk. Při absenci chiazmat může dojít k chybné segregaci; následkem je dizomická nebo nulizomická buňka, tzn. buňka má o jeden chromozom více či méně. Tyto aneuploidie vedou k vážným vývojovým poruchám, či jsou pro buňku letální. Dostupná data (Vrooman et al. 2014) ale ukazují, že většina těchto buněk bývá eliminována při kontrolních bodech v buněčném cyklu. Riziko špatné segregace chromozomů je vyšší nejen u velmi mladých myši, ale i u mladých mužů; velmi mladí muži mají například dvakrát vyšší pravděpodobnost potomka s Downovým syndromem než dospělí otcové. Není však jasné, jestli je mechanismus špatné segregace je stejný u mladých otců i juvenilních myši. Aneuploidie jsou častější u pohlavních chromozomů, protože rekombinace je omezena na velmi malou oblast homologie. Vyšší riziko aneuploidie autozomálních chromozomů u mladších otců bylo dokázáno pro tři chromozomy. Stále ale v současnosti není mnoho studií, které by zkoumali mechanismus nondisjunkcí u otců; mnohem lépe je prozkoumaná nondisjunkce u starších matek.

Chybí studie, které by podrobně vysvětlovaly všechny transkripční, post-transkripční a epigenetické změny všech buněčných stádií. Pro tyto změny může být využita metoda „3S“, která prostřednictvím synchronizované spermatogeneze umožňuje izolovat jednotlivá buněčná stadia pro jejich následné studium.

V současnosti je také málo literatury, která by se přímo zabývala fertilitou spermií z prvních vln spermatogeneze, která je důležitá pro urychlení tvorby myších kmenů. Při mikroinseminaci spermatidou juvenilních myší byla velmi nízká úspěšnost oproti mikroinseminaci spermatidou dospělých jedinců. I přes velmi nízkou úspěšnost ale z těchto spermatid vznikli fertilní potomci. Pro fertilitu není zásadní pouze správný průběh meiózy, důležitou úlohu při oplodnění má také tvar spermie. Pro myší spermie je typická hlavička se zahnutým zobáčkem. U juvenilních myší byly malformace hlavičky časté; čím byla myš mladší, tím byly malformace častější a závažnější. Není však ale jasné, proč je pro oplodnění důležitý právě zahnutý zobáček; konkrétně jeho úhel a přesné zahnutí. Protože hlavička slouží k proniknutí skrze obaly oocyty a následně fúzuje s cytoplazmatickou membránou, je možné, že zahnutý zobáček tuto fázi nějakým způsobem usnadňuje. Chybí studie, které by zkoumaly fertilitu malformovaných spermií juvenilních myší.

Z dosavadních vědeckých poznatků je zřejmé, že určité rysy v procesu spermatogeneze jsou shodné pro lidi i myši; konkrétně jednotlivé buněčné typy spermatogeneze nebo stadia pohlavního dospívání, liší se ale načasování těchto událostí. U myši je spermatogeneze iniciována krátce po narození; spermie z první vlny jsou odvozené přímo z gonocytů, podpůrné testikulární buňky maturují během čtvrté vlny a testes sestupují postnatálně ve třetí vlně spermatogeneze. Tento zrychlený proces je nejspíš adaptace na krátký životní cyklus a umožňuje myši reprodukovat se mnohem dříve, než kdyby spermatogeneze byla iniciovaná po sestupu testes a maturaci testikulárních buněk jako u člověka.

7 Použitá literatura

- ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON a Julian LEWIS, 1998. *Základy buněčné biologie*. B.m.: Espero Publishing.
- AYADI, Abdelkader, Gisèle FERRAND, Isabelle Goncalves da CRUZ a Xavier WAROT, 2011. Mouse Breeding and Colony Management. In: Johan AUWERX, Stephen D. BROWN, Monica JUSTICE, David D. MOORE, Susan L. ACKERMAN a Joseph NADEAU, ed. *Current Protocols in Mouse Biology* [online]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., s. mo100214 [vid. 2019-04-27].
- BAKER, Sean M., Annemieke W. PLUG, Tomas A. PROLLA, C. Eric BRONNER, Allie C. HARRIS, Xiang YAO, Donna-Marie CHRISTIE, Craig MONELL, Norm ARNHEIM, Allan BRADLEY, Terry ASHLEY a R. Michael LISKAY, 1996. Involvement of mouse Mlh1 in DNA mismatch repair and meiotic crossing over. *Nature Genetics* [online]. **13**(3), 336–342.
- BELLVE, A., 1977. Spermatogenic cells of the prepuberal mouse: isolation and morphological characterization. *The Journal of Cell Biology* [online]. **74**(1), 68–85.
- BOLCUN-FILAS, Ewelina a John C. SCHIMENTI, 2012. Genetics of Meiosis and Recombination in Mice. In: *International Review of Cell and Molecular Biology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 179–227 [vid. 2019-03-16].
- BOWLES, J. a P. KOOPMAN, 2007. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* [online]. **134**(19), 3401–3411.
- BUSADA, Jonathan T. a Christopher B. GEYER, 2016. The Role of Retinoic Acid (RA) in Spermatogonial Differentiation1. *Biology of Reproduction* [online]. **94**(1) [vid. 2019-03-13].
- CLAGETT-DAME, Margaret a Danielle KNUTSON, 2011. Vitamin A in Reproduction and Development. *Nutrients* [online]. **3**(4), 385–428.
- DE ROOIJ, Dirk G., 2017. The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development* [online]. **144**(17), 3022–3030.
- DUESTER, Gregg, 2008. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* [online]. **134**(6), 921–931.
- DUTTA, Sulagna a Pallav SENGUPTA, 2016. Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences* [online]. **152**, 244–248.
- ENDO, Tsutomu, Elizaveta FREINKMAN, Dirk G. DE ROOIJ a David C. PAGE, 2017. Periodic production of retinoic acid by meiotic and somatic cells coordinates four transitions in mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **114**(47), E10132–E10141.
- FAISAL, Imrul a Liisa KAUPPI, 2016. Sex chromosome recombination failure, apoptosis, and fertility in male mice. *Chromosoma* [online]. **125**(2), 227–235.
- GERHARD, Danielle, 2013. Animal Physiology. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. **86**(1), 114–114.

- GEYER, Christopher B., 2017. Setting the Stage: The First Round of Spermatogenesis. In: Jon M. OATLEY a Michael D. GRISWOLD, ed. *The Biology of Mammalian Spermatogonia* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 39–63 [vid. 2019-03-31].
- GRISWOLD, 2008. Regulation of spermatogonia. *StemBook* [online]. [vid. 2019-03-20].
- GRISWOLD, Michael D., 2016. Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews* [online]. **96**(1), 1–17.
- GUARNÉ, Alba, 2012. The Functions of MutL in Mismatch Repair. In: *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [online]. B.m.: Elsevier, s. 41–70 [vid. 2019-03-28].
- GUILLON, Hélène, Frédéric BAUDAT, Corinne GREY, R. Michael LISKAY a Bernard DE MASSY, 2005. Crossover and Noncrossover Pathways in Mouse Meiosis. *Molecular Cell* [online]. **20**(4), 563–573.
- HESS, Rex A. a Luiz Renato DE FRANCA, 2009. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium. In: C. Yan CHENG, ed. *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* [online]. New York, NY: Springer New York, s. 1–15 [vid. 2019-03-20].
- HESS, Rex A. a Luiz R. FRANÇA, 2005. Structure of the Sertoli Cell. In: *Sertoli Cell Biology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 19–40 [vid. 2019-03-20].
- HOGARTH, Cathryn A. a Michael D. GRISWOLD, 2013. Retinoic acid regulation of male meiosis: *Current Opinion in Endocrinology & Diabetes and Obesity* [online]. **20**(3), 217–223.
- HUNTER, Neil, 2015. Meiotic Recombination: The Essence of Heredity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* [online]. a016618.
- CHAZOTTE, B., 2011. Labeling Nuclear DNA Using DAPI. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. **2011**(1), pdb.prot5556-pdb.prot5556.
- KANEKO, Takehito, 2015. Simple gamete preservation and artificial reproduction of mammals using micro-insemination techniques. *Reproductive Medicine and Biology* [online]. **14**(3), 99–105.
- KLUIN, Ph. M., M. F. KRAMER a D. G. ROOIJ, 1982. Spermatogenesis in the immature mouse proceeds faster than in the adult. *International Journal of Andrology* [online]. **5**(3), 282–294.
- KRZANOWSKA, H., 1981. Sperm head abnormalities in relation to the age and strain of mice. *Reproduction* [online]. **62**(2), 385–392.
- KRZANOWSKA, H. a B. WABIK-SLIZ, 1994. Frequency of X-Y chromosome dissociation in mouse spermatocytes from interstrain crosses, recombinant inbred strains, and chimeras: possible involvement of paternal genome imprinting. *Molecular Reproduction and Development* [online]. **39**(4), 347–354.
- KRZANOWSKA, Halina, 1989. X-Y chromosome dissociation in mouse strains differing in efficiency of spermatogenesis: Elevated frequency of univalents in pubertal males. *Gamete Research* [online]. **23**(3), 357–365.

- MATSUDA, Y., H. T. IMAI, K. MORIWAKI, K. KONDO a F. BONHOMME, 1982. X-Y chromosome dissociation in wild derived *Mus musculus* subspecies, laboratory mice, and their F1 hybrids. *Cytogenetics and Cell Genetics* [online]. **34**(3), 241–252.
- MIKI, Hiromi, Jiyoung LEE, Kimiko INOUE, Narumi OGONUKI, Yoko NOGUCHI, Keiji MOCHIDA, Takashi KOHDA, Hiroshi NAGASHIMA, Fumitoshi ISHINO a Atsuo OGURA, 2004. Microinsemination with First-Wave Round Spermatids from Immature Male Mice. *Journal of Reproduction and Development* [online]. **50**(1), 131–137.
- MORELLI, Meisha A., Uwe WERLING, Winfried EDELMANN, Mark S. ROBERSON a Paula E. COHEN, 2008. Analysis of meiotic prophase I in live mouse spermatocytes. *Chromosome Research* [online]. **16**(5), 743–760.
- NAKATA, Hiroki, 2019. Morphology of mouse seminiferous tubules. *Anatomical Science International* [online]. **94**(1), 1–10.
- OGURA, Atsuo, Narumi OGONUKI, Kaoru TAKANO a Kimiko INOUE, 2001. Microinsemination, nuclear transfer, and cytoplasmic transfer: the application of new reproductive engineering techniques to mouse genetics. *Mammalian Genome* [online]. **12**(11), 803–812.
- PHILLIPS, Bart T., Kathrin GASSEI a Kyle E. ORWIG, 2010. Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **365**(1546), 1663–1678.
- PICUT, Catherine A., Mary K. ZIEJEWSKI a D. STANISLAUS, 2018. Comparative Aspects of Pre- and Postnatal Development of the Male Reproductive System: Development of the Male Reproductive System. *Birth Defects Research* [online]. **110**(3), 190–227.
- PITNICK, Scott, David J. HOSKEN a Tim R. BIRKHEAD, 2009. Sperm morphological diversity. In: *Sperm Biology* [online]. B.m.: Elsevier, s. 69–149 [vid. 2019-03-14].
- PLUG, Annemieke W a Terry ASHLEY, 1998. Changes in protein composition of meiotic nodules during mammalian meiosis. 11.
- RAVERDEAU, M., A. GELY-PERNOT, B. FERET, C. DENNEFELD, G. BENOIT, I. DAVIDSON, P. CHAMBON, M. MARK a N. B. GHYSELINCK, 2012. Retinoic acid induces Sertoli cell paracrine signals for spermatogonia differentiation but cell autonomously drives spermatocyte meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **109**(41), 16582–16587.
- RIBEIRO, Jonathan, Emilie ABBY, Gabriel LIVERA a Emmanuelle MARTINI, 2016. RPA homologs and ssDNA processing during meiotic recombination. *Chromosoma* [online]. **125**(2), 265–276. ISSN 0009-5915, 1432-0886.
- ROMER, Katherine A., Dirk G. DE ROOIJ, Mina L. KOJIMA a David C. PAGE, 2018. Isolating mitotic and meiotic germ cells from male mice by developmental synchronization, staging, and sorting. *Developmental Biology* [online]. **443**(1), 19–34.

- SHARPE, Richard M, Chris MCKINNELL, Catrina KIVLIN a Jane S FISHER, 2003. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. **125**(6), 769–84.
- SNUSTAD, Peter D. a Michael J. SIMMONS, 2017. *Genetika*. B.m.: muni PRESS.
- STEINER, Bernhard, Rahim MASOOD, Kaspar RUFIBACH, Dunja NIEDRIST, Oliver KUNDERT, Mariluce RIEGEL a Albert SCHINZEL, 2015. An unexpected finding: younger fathers have a higher risk for offspring with chromosomal aneuploidies. *European Journal of Human Genetics* [online]. **23**(4), 466–472.
- TARSOUNAS, Madalena, Takashi MORITA, Ronald E. PEARLMAN a Peter B. MOENS, 1999. Rad51 and Dmc1 Form Mixed Complexes Associated with Mouse Meiotic Chromosome Cores and Synaptonemal Complexes. *The Journal of Cell Biology* [online]. **147**(2), 207–220.
- TEMPLADO, C., L. UROZ a A. ESTOP, 2013. New insights on the origin and relevance of aneuploidy in human spermatozoa. *MHR: Basic science of reproductive medicine* [online]. **19**(10), 634–643.
- TILLINGER, Karl-Gunnar, 1957. TESTICULAR MORPHOLOGY. *Acta Endocrinologica* [online]. **24**(2_Suppl).
- TONG, M.-H., Q.-E. YANG, J. C. DAVIS a M. D. GRISWOLD, 2013. Retinol dehydrogenase 10 is indispensable for spermatogenesis in juvenile males. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **110**(2), 543–548.
- TOSHIMORI, Kiyotaka a Edward M. EDDY, 2015. The Spermatozoon. In: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* [online]. B.m.: Elsevier, s. 99–148 [vid. 2019-03-21].
- VAREA-SANCHEZ, M., M. TOURMENTE, M. BASTIR a E. R. S. ROLDAN, 2016. Unraveling the Sperm Bauplan: Relationships Between Sperm Head Morphology and Sperm Function in Rodents. *Biology of Reproduction* [online]. **95**(1), 25–25.
- VROOMAN, Lisa A., So I. NAGAOKA, Terry J. HASSOLD a Patricia A. HUNT, 2014. Evidence for Paternal Age-Related Alterations in Meiotic Chromosome Dynamics in the Mouse. *Genetics* [online]. **196**(2), 385–396.
- WALKER, William H a Jing CHENG, 2005. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells. *Reproduction* [online]. **130**(1), 15–28.
- YOSHIDA, S., 2006. The first round of mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development* [online]. **133**(8), 1495–1505.
- ZELAZOWSKI, Maciej J., Maria SANDOVAL, Lakshmi PANIKER, Holly M. HAMILTON, Jiaying HAN, Mikalah A. GRIBBELL, Rhea KANG a Francesca COLE, 2017. Age-Dependent Alterations in Meiotic Recombination Cause Chromosome Segregation Errors in Spermatocytes. *Cell* [online]. **171**(3), 601-614.e13.